



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 101 29 815 A 1

⑯ Int. Cl. 7:
C 12 M 1/42
C 12 M 1/40
C 12 N 1/02
C 12 N 11/00
C 12 S 3/00

⑯ Aktenzeichen: 101 29 815 3
⑯ Anmeldetag: 24. 6. 2001
⑯ Offenlegungstag: 9. 1. 2003

DE 101 29 815 A 1

⑯ Anmelder:
PROFOS AG, 93053 Regensburg, DE

⑯ Vertreter:
Dehmel & Bettenhausen, Patentanwälte, 80469
München

⑯ Erfinder:
Kareth, Michael Schütz, Dr., 93138 Lappersdorf, DE;
Graßl, Renate, Dr., 93049 Regensburg, DE; Meyer,
Roman, Dr., 92287 Schmidmühlen, DE; Frick,
Sibylle, 93197 Zeitlarn, DE; Robl, Ingrid, Dr., 93055
Regensburg, DE; Zander, Thomas, 93138
Lappersdorf, DE; Miller, Stefan, Dr., 93053
Regensburg, DE

⑯ Entgegenhaltungen:

DE	199 46 656 A1
DE	199 06 352 A1
DE	198 37 751 A1
DE	195 20 398 A1
US	60 33 878
US	58 76 925
US	49 10 148
WO	98 53 100 A1
WO	98 16 541 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑯ Verfahren zur Aufreinigung von Bakterienzellen und Zellbestandteilen
 ⑯ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Aufreinigung von Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen, wobei die Aufreingung mittels eines Magnetpartikels durchgeführt wird.

DE 101 29 815 A 1

DE 101 29 815 A 1

Beschreibung

- [0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Aufreinigung von Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen, wobei die Aufreinigung mittels eines Magnetpartikels durchgeführt wird.
- 5 [0002] Ausgangspunkt fast jeder Weiterverarbeitung, Analyse oder Isolierung von Zellbestandteilen ist die Anreicherung der Zellen, die "Zellernte". Diese wird üblicherweise mittels Zentrifugation durchgeführt. Dieser Zentrifugations-
schritt stellt das Hauptproblem bei der vollständigen Automatisierung von Verfahren, wie der Plasmidaufreinigung dar, da neben dem hohen technischen Aufwand zur Integration einer Zentrifuge in einer entsprechenden Verarbeitungsrobo-
ter eine extrem hohe Präzision bei Start- und Stop-Position des Zentrifugationsvorganges benötigt wird. Automatische
10 Verfahren der Weiterverarbeitung, Analyse oder Isolierung von Zellbestandteilen beginnen daher in der Regel mit bereits ausserhalb des Verarbeitungsroboters angereicherten, abzentrifugierten oder sedimentierten Zellen. So ist zum Beispiel für eine schnelle Analyse von vollständigen Genomen, Proteomen, aber auch der raschen Struktur- und Funktionsaufklä-
rung in Hochdurchsatzverfahren eine möglichst vollständige Automatisierung der dabei relevanten Verfahren essentiell.
Dabei ist die Automatisierung z. B. in der Genomanalyse bereits weit fortgeschritten: Sowohl die Bakterienanzucht, als
15 auch die Plasmidisolierung können automatisch durchgeführt werden. Eine vollständige Automatisierung des Verfahrens einschließlich der Zellernte ist bisher jedoch nicht durchführbar.
- [0003] Üblicherweise wird die Zellernte mit den folgenden Verfahren durchgeführt: Das Standardverfahren der Zel-
lernte ist die der Abzentrifugation der Bakterienkulturen. Dazu ist gerade bei Verfahren, die für höheren Durchsatz aus-
gelegt werden sollen, eine Mikrotiterplattenzentrifuge nötig. Jedoch ist die Zentrifugation als solches nicht zur Automa-
20 tisierung geeignet.
- [0004] Die Filtration der kultivierten Zellen über entsprechende Filtermembranen ist zwar als solches möglich, jedoch ermöglicht diese nur eine unspezifische Anreicherung der Zellen.
- [0005] Darüberhinaus ist das Verfahren bei hochangereicherten Zellsuspensionen und der damit einhergehenden hohen Viskosität der Lösungen sehr störanfällig bezüglich Verstopfungen.
- 25 [0006] Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ist ein Verfahren, bei dem ein sehr dünner Flüssigkeitsfaden eingesetzt wird, der über Laser eine Sortierung und Anreicherung einzelner fluoreszenzmarkierter Zellen ermöglicht. Durch den dünnen Flüssigkeitsfaden ist das Verfahren auf geringen Durchsatz limitiert. Somit könnten nur geringe Zellmengen ge-
erntet werden, was für die Weiterverarbeitung oder Analyse von Zellbestandteilen nicht ausreichend ist. Die hohen Kosten für die apparative Ausstattung verhindert zudem die starke Verbreitung der Technik und bremst die Parallelisierung,
30 die für eine Hochdurchsatzzellernte nötig ist.
- [0007] Bei der magnetischen Zellseparation werden die Zellen direkt über ionische Wechselwirkungen an Magnetpar-
tikel gebunden und durch Anlegen eines Magnetfeldes lokal aufkonzentriert. Ein derartiges Verfahren wird seit kurzem von Merck AG, Deutschland und Tecan, Schweiz zur vollständigen Automatisierung der Plasmidaufarbeitung inklusive der Zellernte vertrieben. Diese Magnetpartikel haben jedoch den Nachteil, daß sie die Bakterien einerseits unspezifisch
35 und andererseits jedoch nicht jede Bakterienspecies gleich gut binden.
- [0008] Daher liegt der Erfindung die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Bakterienzellen und Zellbestandteile vollautomatisch angereichert werden können, und das in ein automatisiertes Analyse- oder Isolierungs-
verfahren eingebaut werden kann sowie in der Bereitstellung von Magnetpartikeln zur selektiven Anreicherung von Bak-
terienzellen oder Zellbestandteilen.
- 40 [0009] Die Aufgabe wird durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.
- [0010] Der hier verwendete Ausdruck "Phagenproteine" bezeichnet alle Proteine, die an der Erkennung und Bindung der Bakterienzellen oder Zellbestandteile beteiligt sind. Diese können je nach morphologischer Beschaffenheit der Pha-
gen z. B. direkt auf der Phagenhülle oder auf speziellen Erkennungsstrukturen, den Schwanzfasern lokalisiert sein.
- [0011] Der hier verwendete Ausdruck "Spezifität" bedeutet, daß die Bakteriophagen oder Phagenproteine sowohl nur
45 eine einzige Species oder auch Sub-Species Bakterienzellen oder Zellbestandteile erkennen und binden, als auch, daß manche Bakteriophagen oder Phagenproteine auch Bakteriengruppen erkennen und binden.
- [0012] Der hier verwendete Ausdruck "Aufreinigung" oder "Anreicherung" bedeutet das Trennen von Bakterienzellen oder Zellbestandteile von der wässrigen Lösung, z. B. dem Kulturmedium, in der sich die Bakterienzellen oder Zellbe-
standteile befinden. Das Aufreinigen oder Anreichern wird dabei mit Hilfe von Magnetpartikeln durchgeführt.
- 50 [0013] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zur selektiven Aufreini-
gung von Bakterienzellen oder Zellbestandteilen, umfassend die folgenden Schritte: (Zwei-Schritt-Verfahren)
- a) In Kontakt bringen von einer Bakterienzellen oder Zellbestandteile enthaltenden Probe mit Bakteriophagen und/
oder Bakteriophagenproteinen, vorzugsweise mit einer Inkubation von etwa drei bis fünf Minuten,
- 55 b) Zugabe eines magnetischen Trägers zu der Probe,
- c) Inkubation des Trägers mit den an die Bakterienzellen oder Zellbestandteilen gebundenen Bakteriophagen und/
oder Bakteriophagenproteinen, vorzugsweise für etwa drei bis fünf Minuten,
- d) Abtrennen des magnetischen Trägers mit den daran über die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen
gebundenen Bakterienzellen oder Zellbestandteilen von der Probe.
- 60 [0014] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Bakterienzellen oder Zellbestandteile selektiv zum Beispiel aus Mischkulturen angereichert werden. Die Selektivität des Verfahrens wird durch die Auswahl geeigneter Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine ermöglicht. Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine eignen sich für das er-
findungsgemäße Verfahren am besten für eine selektive Anreicherung der Bakterien oder der Zellbestandteile, da Pha-
gen-Bakterien-Systeme in der Natur über lange Zeiträume evolviert sind, so dass die Phagen ihre Wirtsbakterien hoch-
spezifisch und mit hoher Bindungsaaffinität erkennen. Für das erfindungsgemäße Verfahren werden vorzugsweise Bakte-
riophagenproteine verwendet, die für die gewünschten nachzuweisenden Bakterien spezifisch sind. Bakteriophagen wie
auch Bakteriophagenproteine haben sich unter widrigen Umweltbedingungen entwickelt, so dass sie stabil gegenüber

DE 101 29 815 A 1

Einflüssen wie Temperatur-, pH-Schwankungen u. ä. sind und somit in den unterschiedlichsten Aufreinigungspuffern eingesetzt werden können.

[0015] Welche Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine verwendet werden, hängt davon ab, welche Bakterienarten aufgereinigt werden sollen. Für die Plasmidaufreinigung werden Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine bevorzugt, die *E. coli*-Bakterien selektiv binden können. Bereits jetzt steht eine große Zahl bekannter Bakteriophagen für einen Großteil der bisher beschriebenen Bakterien zur Verfügung und kann für die selektive Bakterienanreicherung nutzbar gemacht werden. Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht von Bakterien und den für sie spezifischen Bakteriophagen, ohne den Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben. Die Phagen und die entsprechenden Wirtsbakterien sind u. a. bei folgenden Stammsammlungen erhältlich: ATCC (USA), DSMZ (Deutschland), UKNCC (Großbritannien), NCCB (Niederlande) und MAFF (Japan).

Bakterien:	Phagen
Acholeplasma:	0c1r, 10tur, L2, L51, M1, MVG51, MV-L1, O1, SpV1, V1, V1, V2, V4, V5
Actinomycetes:	108/016, 119, 29, 37, 43, 51, 59.1, A1-Dat, Aeh2, Bir, M1, MSP8, ø115-A, ø150A, ø31C, P-a-1, PhiC, R1, R2, SK1, SV2, VP5
Actinoplanes/Micro-monospora:	Ap3, Ap4, Mm1, Mm3, Mm4, Mm5, phiUW 51
Aeromonas:	43, 44RR2.8t, 65, Aeh1
Aeromonas hydrophila:	PM1
Agrobacterium:	PIIBNV6, PS8, psi, PT11
Alcaligenes:	8764, A5/A6, A6
Alteromonas:	PM2
Armycolatopsis:	W11, W2, W4, W7
Bacillus:	1A, alpha, AP50, BLE, F, G, GA-1, II, IPy-1, mor1, MP13, MP15, ø105, ø29 (phi 29), øNS11, PBP1, PBS1, SP10, SP15, SP3, SP8, SPP1, SPø, SPy-2, SST, type
Bacillus subtilis	168, W23, SP50, W23, SP01
Bdellovibrio:	MAC-1, MAC-2, MAC-4, MAC-5, MAC-7
Brucella:	Tb
Caulobacter:	øCb12r, øCb2, øCb23r, øCb4, øCb5, øCb8r, øCb9, øCP18, øCP2, øCr14, øCr28
Cellulomonas:	O11, O13, O2, O3, O5, O6, O8
Chlamydia:	1
Chlamydia psittaci:	.phi.CPG1
Clostridium:	Ceß, F1, HM2, HM3, HM7
Coryneforme	7/26, A, A19, AN25S-1, Arp, AS-1, BL3, CONX, MT, N1, øA8010, S-6(L), B
Cyanobacteria:	A-4(L), AC-1, LPP-1, S-2L, S-4L, SM-1
<i>E. coli</i> , (O157):	P1, T1, Tula, Tuli, Tuli
<i>E. coli</i> :	1ø3 , 1ø7, 1ø9, 2D/13, Ae2, alpha10, alpha3, BE/1, BF23, dA, delta1, delta6, dø3, dø4, dø5, Ec9, eta8, f1, fd, G13, G14, G4, G6, HK022, HK97, HR, Lambda, M13, M13mp18, M20, MM, MS2, Mu, O1, ø80, øA, øR, øX174, PA-2, P1, P1D, P2, P22, Qø, R17, S13, St-1, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, WA/1, WF/1, WW/1, zeta3, ZG/2, ZJ/2
<i>E. coli</i> R1:	C21
<i>E. coli</i> O8:	omega 8
<i>E. coli</i> (K12):	U3
Enterobacter:	chi, FC3-9, µ2, 01, 11F, 121, 1412, 3, 3T+, 50, 5845, 66F, 7480b, 8893, 9, 9266, a1, alpha15, b4, B6, B7, Beccles, BZ13, C-1, C16, C2, C-2, DdVI, Esc-7-11, f2, fcan, FI, Folac, fr, GA, H, H-19J, I2-2, ialpha, ID2, If1, If2, Ike, JP34, JP501, K19, KU1, M, M11, M12, MS2, NL95, ø92, øI, Øii, Omega8, pilHalp, PR64FS, PRD1, PST, PTB, R, R17, R23, R34, sd, SF, SMB, SMP2, SP, ø, ST, tau, If-1, TH1, TW18, TW28, VIII, VK, W31, X, Y, ZG/1, ZIK/1, ZJ/1, ZU/3, ZS/3

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	<i>Klebsiella pneumoniae</i> :	AP3, C3:
	<i>Lactobacillus</i> :	1b6, 223, fri, hv, hw222a, øFSW, PL-1, y5
5	<i>Lactococcus lactis</i> :	1, 643, c2, kh, ml3, P008, P127, 1358, 1483, 936, 949, BK5-T, c2, KSY1, P001, P006, P107, P335, PO34, PO87
	<i>Leuconostoc</i> :	pro2
	<i>Listeria</i> :	4211,
10	<i>Methanothermobacter</i> :	psi M2 (Ψ M2)
	<i>Micrococcus</i> :	N1, N5
	<i>Mollicutes</i> :	Br1, C3, L3
	<i>Mycobacterium</i> :	I3, lacticola, Leo, ø17, R1-Myb
15	<i>Nocardia/Rhodococcus/Gor dona</i> :	N13, N18, N24, N26, N36, N4, N5
	<i>Nocardioides</i> :	X1, X10, X24, X3, X5, X6, D3, D4,
20	<i>Pasteurella</i> :	22, 32, AU, C-2
	<i>Promicromonospora</i> :	P1, P2, P3, P4
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	Phi CT, phi CTX, PB-1
	<i>Pseudomonas</i> :	12S, 7s, D3, F116, gh-1, gh-1, Kf1, M6, ø1, øKZ, øW-14, Pf1,
25	<i>Pseudonocardia</i> :	W3
	<i>Rhizobium</i> :	2, 16-2-12, 2, 317, 5, 7-7-7, CM1, CT4, m, NM1, NT2, ø2037/1, ø2042, øgal-1-R, WT1
	<i>Saccharomonospora</i> :	Mp1, MP2
	<i>Saccharothrix</i> :	W1
30	<i>Salmonella</i> :	epsilon15, Felix 01, 16-19, 7-11, H-19J, Jersey, N4, SasL1, VII, ZG/3A, San21
	<i>Salmonella typhimurium</i> :	A3, A4, P22
	<i>Spiroplasma</i> :	4, C1/TS2
	<i>Sporichthya</i> :	Sp1
35	<i>Staphylococcus</i> :	107, 187, 2848A, 3A, 44AHJD, 6, 77, B11-M15, Twort
	<i>Streptococcus</i> :	182, 2BV, A25, A25-24, A25-omega8, A25-PE1, A25-VD13, CP-1, Cvir, H39
	<i>Streptomyces</i> :	P23, P26, phi A.streptomycini III, phiB238, phiC31, S1, S2, S3, S4, S6, S7, SH10
	<i>Terrabacter</i> :	Tb1, Tb2
40	<i>Tsukamurella</i> :	Ts1
	<i>Vibrio</i> :	06N-22P, 06N-58P, 06N-58P, 4996, alpha3alpha, I, II, III, IV, kappa, nt-1, OXN-100P, OXN-52P, v6, Vf12, Vf33, VP1, VP11, VP3, VP5, X29
	<i>Xanthomonas</i> :	Cf, Cf1t, RR66,
45	<i>Yersinia</i> :	8/C239, phiYeO3-12, YerA41

[0016] Werden statt Bakteriophagen einzelne Phagenproteine verwendet, so bieten diese den Vorteil, das hier die Eigenschaften eines einzelnen Proteines, statt eines Proteinkomplexes genutzt werden können. Phagenproteine sind sehr stabil; die Stabilität eines Einzelproteins ist wesentlich einfacher zu steuern als die eines Proteinkomplexes. Wichtig ist auch die im Gegensatz zu kompletten Phagen leichtere Modifizierbarkeit (gentechisch, aber auch chemisch), z. B. der Einbau von "Tags". Darüberhinaus bietet der Einsatz von Phagenproteinen Vorteile bei bestimmten Anschlußverfahren, wie z. B. der Isolierung von Nukleinsäuren (Plasmid-DNA, RNA, genomicscher DNA), da im Gegensatz zum Einsatz kompletter Phagen keine Nukleinsäureverunreinigung möglich ist.

[0017] Bevorzugt sind Phagenschwanzproteine aus der Familie der Myoviridae, der Podoviridae und Siphoviridae, insbesondere kurze Phagenschwanzproteine, insbesondere die kurzen Phagenschwanzproteine der "geradzahligen T-Phagen" (z. B. von T4, T2 oder K3, insbesondere das Bakteriophagenschwanzprotein p12 aus T4, p12 aus T2 (GenBank Accession Nummer X56555), p12 aus K3 (vgl. Burda et al., 2000, Biol. Chem., Vol. 381, pp. 255–258) oder die Bakteriophagenschwanzproteine der Phagen Felix 01, P1 oder PB1. Dabei binden zum Beispiel die kurzen Bakteriophagenschwanzproteine der Phagen T4 (p12) und von P1 an Coliforme, das kurze Phagenschwanzprotein von Felix 01 an Salmonellen und das kurze Phagenschwanzprotein von PB1 an Pseudomonaden.

[0018] Wie die Bakteriophagenschwanzproteine an die einzelnen Bakterien binden soll hier beispielhaft an den "geradzahligen T-Phagen" (z. B. T4, T2, K3) verdeutlicht werden. In dieser Gruppe gibt es auf Wirtsseite zwei Komponenten, die von den Phagen erkannt werden: Erstens ein Oberflächenprotein, das spezifisch für individuelle Phagen ist, zweitens das Lipopolysaccharid (LPS), das alle gram-negativen Bakterien in abgewandelter Form besitzen. Die langen Schwanzfasern der "geradzahligen T-Phagen" spielen eine Rolle bei der spezifischen Erkennung der Wirtsbakterien, während das LPS als Rezeptor für die kurzen Schwanzfasern dient. Beim E. coli Phagen T4 ist bekannt, dass die durch die langen Schwanzfasern vermittelte spezifische Interaktion mit dem Wirtsbakterium irreversibel wird, sobald auch die kurzen

DE 101 29 815 A 1

Schwanzfasern an die Bakterienoberfläche gebunden haben. Die kurze Schwanzfaser ist nicht verantwortlich für die genaue Spezifität innerhalb der Wirtsbakteriengruppe und kann deshalb zwischen den verschiedenen "geradzahligen T-Phagen" ausgetauscht werden.

[0019] Bakteriophagenschwanzproteine können leicht rekombinant in grossen Mengen produziert werden. Phagen wie Wirtsstämme sind grösstenteils über Stammssammlungen kommerziell erhältlich, bzw. mit einfachen Mitteln isolierbar. Für das erfundungsgemäße Verfahren können jedoch nicht nur die natürlicherweise vorkommenden Bakteriophagenschwanzproteine verwendet werden, sondern auch deren Varianten. Varianten bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, dass die Bakteriophagenschwanzproteine eine veränderte Aminosäuresequenz aufweisen. Diese können durch Screening der natürlich auftretenden Varianten, oder durch Zufalls-Mutagenese oder gezielte Mutagenese, aber auch durch chemische Modifikation erhalten werden. Die für das erfundungsgemäße Verfahren verwendeten Bakteriophagenschwanzproteine können durch eine gezielte oder zufällige Mutagenese in ihrer Wirtsspezifität bzw. ihren Bindungseigenschaften an die Trägerstrukturen angepaßt werden. Durch die Mutagenese werden Mutationen eingeführt, die Aminosäureadditionen, -deletionen, -substitutionen oder chemische Modifikationen sein können. Diese Mutationen bewirken eine Veränderung der Aminosäuresequenz in der Bindungsregion der Phagen oder Phagenproteine, mit dem Ziel, Spezifität und Bindungsaaffinität an Testbedürfnisse anzupassen, z. B. die Bindung der Bakterien an die isolierten Phagenproteine zu erhöhen oder irreversibel zu machen, um die Waschmöglichkeiten zu verbessern. Darüber hinaus kann eine gentechnische oder biochemische Modifikation der Phagenproteine durchgeführt werden, mit dem Ziel, die gegebenenfalls vorhandene enzymatische Aktivität auszuschalten, um dadurch die Bindung zu verbessern oder irreversibel zu machen.

[0020] Zur Bindung der zu aufzureinigenden Bakterien und/oder Zellbestandteilen an die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenschwanzproteine wird die Probe, z. B. eine Übernachtkultur mit den Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenschwanzproteinen in Kontakt gebracht und vorzugsweise inkubiert. Die Inkubation erfolgt bei einer Temperatur im Bereich von 4° bis 90°C, vorzugsweise bei einer Temperatur im Bereich von 4° bis 45°C, besonders bevorzugt bei einer Temperatur im Bereich von 15° bis 37°C, insbesondere bevorzugt bei einer Temperatur im Bereich von 20° bis 37°C, insbesondere bei RT, für bis zu 6 Stunden, vorzugsweise bis zu 4 Stunden, besonders bevorzugt 2 Stunden, insbesondere 1 Stunde, insbesondere bevorzugt 1 bis 20 Minuten, ganz besonders bevorzugt 3 bis 5 Minuten. Beispielsweise kann die Inkubation 2 bis 120 min bei 4° bis 37°C, bevorzugt für 20 bis 30 min bei 25°C oder 37°C, besonders bevorzugt für 3 bis 5 min bei 37°C erfolgen.

[0021] Anschließend werden Magnetpartikel (paramagnetisch oder ferromagnetisch) als Trägerstrukturen zugegeben. Die Magnetpartikel binden den Bakteriophagen/Bakteriophagenprotein-Bakterien/Zellbestandteil-Komplex, der dann einfach mittels einer Magnetvorrichtung von der Probe abgetrennt und aufgereinigt werden kann. Die Magnetvorrichtung kann dabei an der Außenseite des Gefäßes positioniert sein und entweder zur Anreicherung eingeschaltet werden, so daß die Magnetpartikel sich an der Gefäßwand sammeln, oder an der Gefäß Außenseite entlanggleiten, so daß die Magnetpartikel sich z. B. am Boden des Gefäßes sammeln. Bevorzugt ist die Anreicherung mit einem Permanetmagneten. Die Magnetvorrichtung kann auch in das Gefäß und in die Probe eintauchen, so daß die Magnetpartikel sich an der Magnetvorrichtung niederschlagen (die Magnetvorrichtung kann dabei durch eine Pipettenspitze oder ein vergleichbares Disposable bedeckt sein). Im Gegensatz zu Zentrifugations- oder Filtrationstechniken unterliegen die Bakterien nur minimalen Scherkräften und können somit mit hoher Ausbeute bei Bedarf auch aktiv/lebend angereichert werden. Die einfache Handhabung erleichtert einfache schnelle Puffer-/Lösungswechsel und kann sowohl leicht im großen Maßstab durchgeführt werden, wie auch gut automatisiert werden.

[0022] Die Magnetpartikel haben einen Durchmesser, der erlaubt eine ausreichende Menge an Zellen oder Zellbestandteilen je Partikel zu binden, vorzugsweise haben die Magnetpartikel einen Durchmesser von 0,5 bis 2 µm, vorzugsweise 1 µm.

[0023] Die Bindung des Bakteriophagen/Bakteriophagenprotein-Bakterien/Zellbestandteil-Komplexes an die Magnetpartikel erfolgt vorzugsweise über geeignete Kopplungsgruppen, insbesondere Polypeptide und/oder niedermolekulare Substanzen. Diese Polypeptide können für die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine spezifische Antikörper, Lektine, Rezeptoren oder Anticaline sein. Ferner können die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine mit niedermolekularen Substanzen z. B. Biotin verknüpft sein, um über diese niedermolekularen Substanzen an Polypeptide z. B. Streptavidin zu binden, die ihrerseits auf dem Träger immobilisiert wurden. Statt Biotin kann ferner der sogenannte Strep-Tag (Skerra, A. & Schmidt, T. G. M. Biomolecular Engineering 16 (1999), 79–86) verwendet werden, der eine kurze Aminosäuresequenz ist und an Streptavidin bindet. Der Strep-Tag wird vorzugsweise über DNA-Rekombinationstechnologie an die rekombinant hergestellten Bakteriophagenproteine gebunden.

[0024] Zur Bindung des Komplexes werden die Magnetpartikel mit dem Bakteriophagen/Bakteriophagenprotein-Bakterien/Zellbestandteil-Komplex in Kontakt gebracht und vorzugsweise inkubiert. Die Inkubation erfolgt bei einer Temperatur im Bereich von 4° bis 90°C, vorzugsweise bei einer Temperatur im Bereich von 4° bis 45°C, besonders bevorzugt bei einer Temperatur im Bereich von 15° bis 37°C, insbesondere bevorzugt bei einer Temperatur im Bereich von 20° bis 37°C, insbesondere bei RT, für bis zu 6 Stunden, vorzugsweise bis zu 4 Stunden, besonders bevorzugt 2 Stunden, insbesondere 1 Stunde, insbesondere bevorzugt 1 bis 20 Minuten, ganz besonders bevorzugt 3 bis 5 Minuten. Beispielsweise kann die Inkubation 2 bis 120 min bei 4° bis 37°C, bevorzugt für 20 bis 30 min bei 25°C oder 37°C, besonders bevorzugt für 3 bis 5 min bei 37°C erfolgen.

[0025] Die Anreicherung bzw. Aufreinigung der Bakterienzellen und/oder Zellbestandteile kann jedoch auch in einem Verfahren durchgeführt werden, das folgende Schritte umfaßt: (Ein-Schritt-Verfahren)

- a) In Kontakt bringen von einer Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen enthaltenden Probe mit einem magnetischen Träger, auf dessen Oberfläche Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine aufgebracht sind, vorzugsweise mit einer Inkubation von etwa drei bis fünf Minuten,
- b) Abtrennen des magnetischen Trägers mit den daran gebundenen Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen von der Probe.

DE 101 29 815 A 1

- [0026] Die erfindungsgemäßen Verfahren können zum Beispiel als Zentrifugationsersatz verwendet werden, und somit erstmalig die automatische Aufreinigung von Bakterienzellen ermöglichen. Damit ist erstmalig eine vollständige Automatisierung zum Beispiel der Genomanalyse möglich, d. h. von der Animpfung von Bakterienkulturen bis zur Ermittlung der Sequenz. Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren zum Beispiel zur Isolierung von Zellbestandteilen, insbesondere von Lipopolysacchariden oder Exopolysacchariden verwendet werden.
- [0027] Die nachstehenden Ausführungen über die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine gelten entsprechend auch für die Polypeptide. Die Beschichtung des Magnetpartikels mit dem vorstehend beschriebenen Polypeptiden oder den Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen kann auf verschiedene Weise erfolgen.
- [0028] Die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine können über kovalente Kopplung an den Magnetpartikel fixiert werden. Die damit mögliche sehr feste Bindung an den Träger ermöglicht den Einsatz harscher Waschbedingungen für das für die Weiterverarbeitung der angereicherten Zellen evtl. erforderliche Waschen der Zellen. Die Kopplung der Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine über Adsorption ist ein sehr einfaches und kostengünstiges Verfahren. Durch Kopplung der Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine über Biotin/Streptavidin oder vergleichbare Ligand/Rezeptor-Systeme sind sowohl Ein-Schritt-, als auch Zwei-Schritt-Verfahren möglich. Das in diesem Ansatz verwendete Streptavidin kann sowohl über Adsorption als auch über chemische Kopplung fixiert sein. Wichtig bei der Beschichtung ist eine funktionelle Immobilisierung, d. h. die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen verfügen trotz Bindung an den Magnetpartikel über für Bakterien zugängliche Strukturen.
- [0029] Bei der kovalenten Kopplung können die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine z. B. über primäre Aminogruppen oder Carboxylgruppen an bereits vom Hersteller aktivierte Trägermaterialien, z. B. Magnetpartikel von Merck, Estapor, etc. über Standardbedingungen, z. B. -NH₂ über Cyanurylchlorid (Russian Chemical Rev., 1964, 33: 92–103), oder -COO⁻ über EDC (1-Ethyl-3-[3'Dimethylaminopropyl]carbodiimid) (Anal. Biochem. 1990, 185: 131–135) gekoppelt werden. Darüberhinaus können die Magnetpartikel mit geeigneten Verfahren direkt aktiviert werden.
- [0030] Die Immobilisierung der Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine an das Trägermaterial mittels Adsorption kann durch Inkubation einer Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine-Lösung in wässrigem Puffer, z. B. 100 mM Tris pH 7.3 oder 100 mM Natriumphosphat pH 7.5, PBS (10 mM Natriumphosphat pH 7.4, 150 mM Natriumchlorid), über mehrere Stunden oder über Nacht bei 4°C bis 45°C, vorzugsweise bei 15°C bis 37°C, besonders bevorzugt bei 20°C bis 37°C, insbesondere bevorzugt bei 37°C oder RT, insbesondere bevorzugt bei 30–65°C für 2–4 h durchgeführt werden. Nach der Adsorption wird die Beschichtungslösung abgenommen und die Trägerstruktur in wässriger, ggfs. gepufferter Lösung gelagert.
- [0031] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Magnetpartikel entweder beschichtet mit Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen oder gegen Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine gerichteten Polypeptiden. Diese Polypeptide können für die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine spezifische Antikörper, Lektine, Rezeptoren oder Anticaline sein. Ferner können die Magnetpartikel mit Streptavidin beschichtet sein.
- [0032] Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind Bakteriophagenproteine, an die der Strep-Tag gekoppelt ist. Bevorzugt ist die Kopplung über DNA-Rekombinationstechnologie. Herstellung der Nukleinsäure, umfassend die Sequenz des Bakteriophagenproteins und des Strep-Tags und die Herstellung des Expressionsprodukts sind Stand der Technik und brauchen hier nicht gesondert erläutert zu werden. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Nukleinsäuresequenz, die ein Bakteriophagenprotein und den Strep-Tag codiert. Ein besonders bevorzugtes mit dem Strep-Tag modifiziertes Bakteriophagenprotein ist das p12-Protein vom Phagen T4, jedoch sind alle anderen Bakteriophagenproteine in der obigen Tabelle ebenfalls bevorzugt.
- [0033] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen Kit zur Anreicherung von Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen, umfassend die erfindungsgemäßen Magnetpartikel sowie die für die Anreicherung der Bakterien und/oder Zellbestandteilen notwendigen Lösungen mit den Testreagentien.
- [0034] Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als einschränkend aufzufassen. Sofern nicht anders angegeben, wurden molekularbiologische Standardmethoden verwendet, wie z. B. von Sambrook et al., 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben.
1. Die Reinigung von T4 p12 erfolgte nach der von Burda, M. R. & Miller, S. Eur J Biochem. 1999 265 (2), 771–778 beschriebenen Vorschrift. Zur Biotinylierung wurden entweder EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin oder EZ-Link™ TTP-PEO-Biotin von Pierce, USA verwendet und die Biotinylierung nach den vom Hersteller angegebenen Vorschriften durchgeführt. Dabei wurden für die Biotinylierung ca. 30 Moleküle Biotin pro p12Trimer eingesetzt, letztendlich gekoppelt waren 5–10 Moleküle Biotin pro p12-Trimer.
2. Zellbindung: Zu 300–500 µl Bakterien-Zellsuspension in einer 96er Mikrotiterplatte (Greiner, Deutschland) wurden 6–10 µl biotinyliertes p12 (0.84 mg/ml in 100 mM Tris 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)) zugegeben, kurz gemischt durch 2–3 maliges Auf- und Abpipettieren und anschliessend für 1–5 Minuten bei RT inkubiert.
3. Zugabe der Magnetpartikel: Anschliessend wurden 20 µl Magnetpartikel (Merck MagPrep 1%ige Lsg, Durchmesser ca. 1 µm) zugegeben, kurz gemischt durch 2–3 maliges Auf- und Abpipettieren und anschliessend für 1–5 Minuten bei RT inkubiert.
4. Abtrennung des BPProteinzellkomplexes: Zur Anreicherung der Zellen wurde die Mikrotiterplatte auf einen geeigneten Magnetseparator (Bilatec AG, Mannheim) transferiert und 2–4 min bei RT inkubiert zur Abscheidung der gebundenen Bakterien an der Gefäßwand. Der dabei erhaltene Überstand aus Kulturmedium wurde abpipettiert und verworfen. 5. Weiterverarbeitung: Zur Weiterverarbeitung wurden die Zellen je nach Bedarf gewaschen 2–3× mit PBS (10 mM NaPi pH 7.4, 150 mM NaCl) oder PBST (PBS, 0.05% Tween 20). Typischerweise wurden in diesem Verfahren 4–5 Bakterien pro Magnetpartikel gebunden, beim Waschen der Zellen wurde die Effizienz um 50% verringert. Anschliessend wurden die Magnetpartikel-gekoppelten Zellen je nach Bedarf in ein neues Gefäß transferiert

DE 101 29 815 A 1

oder verblieben zur Weiterbearbeitung im Gefäß. Bei der Plasmidisolierung anschliessend Kits von Bilatec, Mannheim (Magnetpartikel-Kit) oder Qiagen, Hilden (Säulen-Kit) verwendet. Unterverwendung der jeweiligen Herstellervorschriften wurden die entsprechend den im Kit beschriebenen Zentrifugationsstufen vergleichbaren Plasmidausbeuten und Qualitäten gefunden.

5

Patentansprüche

1. Verfahren zur selektiven Aufreinigung von Bakterienzellen oder Zellbestandteilen, umfassend die folgenden Schritte:

- a) In Kontakt bringen von einer Bakterienzellen oder Zellbestandteilen enthaltenden Probe mit Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen,
- b) Zugabe eines Magnetpartikels zu der Probe,
- c) Inkubation des Magnetpartikels mit den an die Bakterienzellen oder Zellbestandteilen gebundenen Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen,
- d) Abtrennen des Magnetpartikels mit den daran über die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen gebundenen Bakterienzellen oder Zellbestandteilen von der Probe.

2. Verfahren zur selektiven Aufreinigung von Bakterienzellen oder Zellbestandteilen, umfassend die folgenden Schritte:

- a) In Kontakt bringen von einer Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen enthaltenden Probe mit einem Magnetpartikel, auf dessen Oberfläche Polypeptide, Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine aufgebracht sind,
- b) Abtrennen des Magnetpartikels mit den daran gebundenen Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen von der Probe.

3. Magnetpartikel beschichtet mit Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen.

4. Magnetpartikel nach Anspruch 4, wobei die Bakteriophagen und/oder die Bakteriophagenproteine ausgewählt sind aus der Gruppe Oc1r, 10tur, L2, L51, M1, MVG51, MV-L1, O1, SpV1, V1, V2, V4, V5, 108/016, 119, 29, 37, 43, 51, 59.1, A1-Dat, Aeh2, Bir, M1, MSP8, φ115-A, φ150A, φ31C, P-a-1, PhiC, R1, R2, SK1, SV2, VPS, Ap3, Ap4, Mm1, Mm3, Mm4, Mm5, phiUW 51, 43, 44RR2.81, 65, Aeh1, PM1, PIBNV6, PS8, psi, PT11, 8764, A5/A6, A6, PM2, W11, W2, W4, W7, 1A, alpha, AP50, BLE, F, G, GA-1, II, IPy-1, mor1, MP13, MP15, φ105, φ29 (phi 29), φNS11, PBP1, PBS1, SP10, SP15, SP3, SPB, SPP1, SPβ, SPy-2, SST, type, 168, W23, SP50, W23, SP01, MAC-1, MAC-2, MAC-4, MAC-5, MAC-7, Tb, φCb12r, φCb2, φCb23r, φCb4, φCb5, φCb8r, φCb9, φCP18, φCP2, φCr14, φCr28, O11, O13, O2, O3, O5, O6, O8, 1, .phi.CPG1, Ceβ, F1, HM2, HM3, HM7, 7/26, A, A19, AN25S-1, Arp, AS-1, BL3, CONX, MT, N1, φA8010, S-6(L), β-A-4(L), AC-1, LPP-1, S-2L, S-4L, SM-1, P1, T1, Tula, Tull, 1φ3, 1φ7, 1φ9, 2D/13, Ae2, alpha10, alpha3, BE/1, BF23, dA, delta1, delta6, dφ3, dφ4, dφ5, Ec9, eta8, f1, fd, G13, G14, G4, G6, HK022, HK97, HR, lambda, M13, M13mp18, M20, MM, MS2, Mu, O1, φ80, φA, φR, φX174, PA-2, P1, P1D, P2, P22, Q8, R17, S13, St-1, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, WA/1, WF/1, WW/1, zeta3, ZG/2, ZJ/2, C21, omega 8, U3, chi, FC3-9, μ2, 01, 11F, 121, 1412, 3, 3T+, 50, 5845, 66F, 7480b, 8893, 9, 9266, a1, alpha15, b4, B6, B7, Beccles, BZ13, C-1, C16, C2, C-2, DdVI, Esc-7-11, f2, fcan, FI, Folac, fr, GA, H, H-19J, I2-2, Ialpha, ID2, If1, If2, Ike, JP34, JP501, K19, KUI, M, M11, M12, MS2, NL95, φ92, φl, Øii, Omega8, pilHalp, PR64FS, PRD1, PST, PTB, R, R17, R23, R34, sd, SF, SMB, SMP2, SP, β, ST, tau, tf-1, TH1, TW18, TW28, ViII, VK, W31, X, Y, ZG/I, ZIK/I, ZJ/I, ZL/3, ZS/3, AP3, C3, lb6, 223, fti, hv, hw222a, φFSW, PL-1, y5, 1, 643, c2, kh, ml3, P008, P127, 1358, 1483, 936, 949, BK5-T, c2, KSY1, P001, P008, P107, P335, PO34, PO87, pro2, 4211, psi M2 (ΨM2), N1, N5, Br1, C3, L3, I3, lacticola, Leo, φ17, R1-Myb, N13, N18, N24, N26, N36, N4, N5, X1, X10, X24, X3, X5, X6, D3, D4, 22, 32, AU, C-2, P1, P2, P3, P4, Phi CT, phi CTX, PB-1, 12S, 7s, D3, FI16, gh-1, Kf1, M6, φ1, φKZ, φW-14, Pf1, W3, 2, 16-2-12, 2, 317, 5, 7-7-7, CM1, CT4, m, NM1, NT2, φ2037/1, φ2042, φgal-1-R, WT1, Mp1, MP2, W1, epsilon15, Felix 01, 16-19, 7-11, H-19J, Jersey, N4, SasI1, ViI, ZG/3A, San21, A3, A4, P22, 4, C1/TS2, Sp1, 107, 187, 2848A, 3A, 44AHJD, 6, 77, B11-M15, Twort, 182, 2BV, A25, A25-24, A25-omega8, A25-PE1, A25-VD13, CP-1, Cvir, H39, P23, P26, phi A. streptomycini III, phi8238, phiC31, S1, S2, S3, S4, S6, S7, SH10, Tb1, Tb2, Ts1, 06N-22P, 06N-58P, 4996, alpha3alpha, I, II, III, IV, kappa, nt-1, OXN-100P, OXN-52P, v6, Vf12, Vf33, VP1, VP11, VP3, VP5, X29, Cf, Cf1t, RR66, 8/C239, phiYeO3-12, YerA41.

5. Magnetpartikel nach Anspruch 3 oder 4 mit einem Durchmesser von 0,5 bis 2 µm, insbesondere 1 µm.

6. Bakteriophagenprotein, umfassend einen Strep-Tag.

7. Bakteriophagenprotein nach Anspruch 6, wobei das Bakteriophagenprotein das pI2-Protein des Phagen T4 ist.

8. Bakteriophagenprotein nach Anspruch 6 oder 7, wobei das Bakteriophagenprotein mittels DNA-Rekombinationstechnik hergestellt ist.

9. Nukleinsäure mit einer Sequenz, die ein Bakteriophagenprotein und den Strep-Tag codiert.

10. Verwendung der Magnetpartikel nach einem der Ansprüche 3 bis 5 oder der Bakteriophagenproteine nach einem der Ansprüche 6 bis 8 zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere zur Plasmidpräparation, von Zellbestandteilen, insbesondere von Lipopolysacchariden oder Exopolysaccharide.

11. Kit zur Aufreinigung von Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen, umfassend die Magnetpartikel nach einem der Ansprüche 3 bis 5 und/oder der Bakteriophagenproteine nach einem der Ansprüche 6 bis 8.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -